Fermenthistochemie am Epithelkörperchen

Hans-Jürgen Nolte

1962

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

Fermenthistochemie am Epithelkörperchen

Inaugural-Dissertation

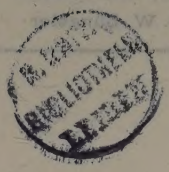
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Jürgen Nolte
aus Freiburg/Br.

München 1962

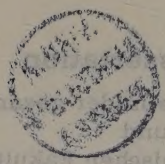
A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. M. EDER
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. BÜNGELER
Dekan:	Prof. Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 5.6.1962



INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Vergleichende Fermenthistochemie an unbehandelten Epithelkörperchen des Menschen, der Ratte, des Goldhamsters und Meerschweinchens	7
III.	Fermenthistochemische Untersuchungen zur Frage der Parathormonsynthese	12
IV.	Fermentcytochemische Untersuchungen bei experimenteller Belastung	22
V.	Zusammenfassung	35
VI.	Literaturverzeichnis	37

I. EINLEITUNG

Die Bearbeitung biologischer Probleme unter physiologischen und pathologischen Bedingungen hat durch die Entwicklung zahlreicher neuer Untersuchungsverfahren im letzten Jahrzehnt völlig neue Wege geöffnet. Neben der Verfeinerung morphologischer Untersuchungsmethoden, die das Studium der Ultrastruktur ermöglichen, und der stürmischen Entwicklung biochemischer Untersuchungsverfahren sind eine Vielzahl von histochemischen Methoden entwickelt worden. Ihre Anwendung ermöglicht in zunehmendem Mass die Lokalisation von Stoffwechselvorgängen im Gewebe unter Erhalt der Struktur durch den Nachweis von Stoffwechselprodukten und den für den Stoffumsatz verantwortlichen Enzymen.

Vor allem der histochemische Nachweis von Enzymen ist in den letzten Jahren methodisch so erweitert worden, dass nunmehr der Einsatz dieser Untersuchungsverfahren für das Studium physiologischer und pathologischer Stoffwechselvorgänge sinnvoll erscheint. Besondere Bedeutung erlangen histochemische Untersuchungsmethoden an Organen, die aus Zellen mit verschiedenen Funktionen zusammengesetzt sind, so dass eine getrennte Isolierung von Zellen gleicher Funktion unmöglich ist, oder an so kleinen Organen, dass deren exakte Präparation aus dem übrigen Strukturverband auf grösste Schwierigkeiten stösst. Dies trifft in besonderem Mass für innersekretorische Organe zu. Mehr als bei jedem anderen Organsystem beruht hier die Beurteilung in der Charakterisierung der Stoffwechselvorgänge. Hierin liegt die besondere Bedeutung chemischer bzw. biochemischer Analysen. Die Notwendigkeit zum Einsatz histochemischer Untersuchungsverfahren ergibt sich jedoch dann, wenn wie an der Hypophyse Zellen verschiedener Funktion auf engstem Raum vermischt angeordnet sind, oder wenn Organe wie die Epithelkörperchen vieler Versuchstiere so klein sind, dass sie nicht mit genügender Exaktheit isoliert werden können. Die Deutung histochemischer Enzymbefunde ist jedoch begrenzt. Entscheidend ist hierbei die Tatsache, dass histochemisch eine Reihe von Enzymen nachweisbar ist, jedoch bei weitem noch zu wenig, um zahlreiche wichtige Fragen des Stoffwechsels zu beantworten. Eine weitere erhebliche Schwierigkeit ist in der Tatsache begründet, dass histochemische Enzymnachweise qualitativer und nicht quantitativer Art sind. Wie gezeigt werden wird, lassen sich jedoch durch bestimmte Modifikationen der Untersuchungsmethode zumindest grobe Anhaltspunkte über Veränderungen des Substratumsatzes auf Grund geänderter Enzymaktivität machen. Entscheidend ist hierbei die kombinierte Anwendung enzymhistochemischer Nachweisverfahren mit morphologischen Untersuchungsmethoden und gezielten experimentellen Versuchsbedingungen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch Anwendung fermenthistochemischer Methoden Einblicke in den Stoffwechsel des Epithelkörperchens unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu gewinnen. Im 1. Abschnitt der Arbeit wird über systematische vergleichende Untersuchungen der histochemisch nachweisbaren Enzyme in den Epithelkörperchen von Mensch, Goldhamster, Meer-

schweinchen und Ratte berichtet. Eine derartige vergleichende Untersuchung erschien notwendig, obwohl biochemisch keine Anhaltspunkte dafür vorliegen, dass die Parathormonbildung bei den verschiedenen Species Unterschiede aufweist. Andererseits haben jedoch vergleichende histochemische Untersuchungen an anderen Objekten unter ähnlichen Bedingungen Artunterschiede aufgedeckt, so dass eine Prüfung notwendig erschien.

Im 2. Teil der Arbeit wird über Untersuchungen an Rattenepithelkörperchen unter Anwendung des Enzymnachweises für l-Leucylaminopeptidase (LAP) berichtet. Dieses Ferment, zum ersten Mal von LINDERSTRÖM-LANG (31) erwähnt, ist in Mikro- und Makroorganismen des Tier- und Pflanzenreichs weit verbreitet. So war es von Bedeutung, als es GOMORI (17a) gelang, die LAP mit Chloracetylamin als histochemischem Substrat nachzuweisen. Auf den Untersuchungen von GOMORI (17a) aufbauend, suchten GREEN und Mitarbeiter (19) und FOLK und BURSTONE (14) nach einem spezifischen Substrat und verwandten l-Leucyl-ß-naphthylamid-hydrochlorid. Dieser Methode liegen auch heute die meisten LAP-Darstellungsmethoden zu Grunde. PEARSE und TREMBLAY (37a) fanden, dass im Epithelkörperchen der Ratte histochemisch sehr reichlich LAP nachweisbar ist. Da das Hormon des Epithelkörperchens, das Parathormon, ein Proteohormon ist, erschien der Nachweis eines am Eiweissstoffwechsel beteiligten Enzyms im Epithelkörperchen dieser Tierart von besonderem Interesse im Hinblick auf einen möglichen Zusammenhang mit der Hormonbildung oder Hormonausschüttung. Deshalb versuchten PEARSE und TREMBLAY (37a) festzustellen, ob und welche Beziehungen zwischen den verschiedenen, durch Eingriffe in den Phosphor-Calcium-Stoffwechsel experimentell erzeugbaren Funktionszuständen des Ratten-Epithelkörperchens und der nachweisbaren LAP-Aktivität bestehen. Gezielte Eingriffe in das humorale Phosphor-Calcium-Gleichgewicht mit der Absicht, die Epithelkörperchenfunktion experimentell zu steuern, basieren auf der Tatsache, dass eine Erhöhung des Phosphorspiegels im Blut bzw. eine Verminderung des Calciumspiegels eine Stimulierung und umgekehrt eine Erhöhung des Calciumspiegels bzw. eine Erniedrigung des Phosphorspiegels eine Dämpfung der Epithelkörperchenaktivität erzeugt (7, 12, 13, 38, 43, 37a). PEARSE und TREMBLAY (37a) fanden eine histochemisch und colorimetrisch erfassbare verminderte Substratumsetzung der LAP an Epithelkörperchen von Ratten, die 15-21 Tage mit Dihydrotachysterol behandelt waren. Eine gesteigerte Substratumsetzung nach Behandlung mit phosphorreicher und Vitamin D-freier Diät wurde ebenfalls nachgewiesen. Die Autoren nehmen auf Grund dieser Befunde an, dass die LAP in die Bereitstellung des Parathormons eingreift. Der Angriffspunkt des Ferments wird auf die unmittelbare Hormonvorstufe verlegt. Im 2. Teil der Arbeit wird über eigene Untersuchungen berichtet, in denen die Frage einer Parallelität zwischen LAP-Aktivität und Parathormonsynthese geprüft wird. Die Versuchsanordnung unterscheidet sich dabei von der von PEARSE und TREMBLAY (37a) verwandten.

Im 3. Abschnitt der Arbeit wird über die intracelluläre Fermentverteilung

bei normalen und stimulierten Epithelkörperchenzellen am Beispiel der LAP berichtet. Anlass zu diesen Untersuchungen war die Beobachtung von EDER und HARTL (12), dass nach einmaliger Phosphatstimulierung bereits nach der kurzen Zeitspanne von 3 min tiefgreifende Strukturumwandlungen in Epithelkörperchenzellen auftreten. Diese Befunde wurden in den Funktionszyklus, den ALTMANN (2a, 2b) über den Nucleinsäurestoffwechsel zwischen Kern und Cytoplasma aufgestellt hat, eingeordnet. Während CASPERSSON (8a, 8b) in seinen ersten Untersuchungen annahm, dass bei der Proteinsynthese Nucleolarsubstanz diffus vom Kern in das Cytoplasma abgegeben wird, stellte ALTMANN (2a, 2b) eine morphologisch erfassbare Ausstossung von Nucleolusbestandteilen fest. Ganz entsprechende Befunde beobachteten EDER und HARTL (12) bei der Stimulierung des Epithelkörperchens, deren Zellen mit der Bildung des Parathormons eine erhebliche Steigerung der Proteinsynthese leisten müssen. Da die hierbei auftretenden Veränderungen am Nucleolus bereits innerhalb weniger Minuten auftreten, wurde geprüft, ob das an Rattenepithelkörperchen histochemisch erfassbare Enzym LAP ebenfalls bereits in dieser kurzen Zeitspanne Änderungen hinsichtlich des Substratumsatzes oder der intracellulären Enzymverteilung aufweist.

II. VERGLEICHENDE FERMENTHISTOCHEMIE AN UNBEHANDELTEN EPITHELKÖRPERCHEN DES MENSCHEN, DER TATTE, DES GOLDHAMSTERS UND DES MEERSCHWEINCHENS

Die folgenden Untersuchungen geben einen Überblick über das Vorkommen verschiedener Enzyme, die mit den derzeit gebräuchlichen histochemischen Fermentdarstellungsmethoden erfassbar sind.

Beobachtungsgut

a) Mensch: 18 menschliche, aus dem Sektionsgut stammende Epithelkörperchen wurden auf sämtliche der unten angegebenen Fermente untersucht. Der Zeitraum zwischen Todeseintritt und Untersuchungszeitpunkt schwankte zwischen 6 und 24 h.

b) Ratte: 20 Tiere aus institutseigener Zucht, zwischen 120 und 250 g schwer, davon 10 männliche und 10 weibliche.

c) Meerschweinchen: 10 Tiere aus institutseigener Zucht, männlich, zwischen 500 und 750 g schwer.

d) Goldhamster: 10 Tiere aus institutseigener Zucht, männlich, zwischen 200 und 250 g schwer.

Methode

Menschliche Epithelkörperchen wurden nach Präparation eingefroren und Kryostatschnitte angefertigt. Die Epithelkörperchen der Versuchstiere wurden nach Entnahme eines Schilddrüsenlappens in Gelatine mit CO_2-Schnee bei -70°C eingeforen und durch 8 my dicke, im Kryostaten angefertigte Nativserienschnitte aufgesucht. An mit HE gefärbten Probeschnitten wurde festgestellt, ob das Epithelkörperchen getroffen war; danach wurde die Enzymreaktion angefertigt. Die Beurteilung der histochemisch dargestellten Fermente erfolgte auf Grund der Intensität ihrer charakteristischen Farbreaktionen. Die Farbintensität wurde tabellarisch erfasst und eine Skala aufgestellt, deren Werte von (+) = schwach positiv über +, +(+), ++, ++(+) zu +++ führen.

Enzymreaktionen:

a) l-Leucylaminopeptidase (LAP) nach NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (32). Substrat: l-Leucyl-ß-naphthylamidhydrochlorid. Inkubationszeit: 30 min.

b) Trypsin-ähnliches Ferment mit Esterase-Aktivität nach GLENNER und COHEN (16). Substrat: N-benzoyl-dl-arginin-ß-naphthylamidhydrochlorid. Inkubationszeit: 30 min.

c) Unspezifische Esterase nach PEARSE (36). Substrat: alpha-naphthyl-acetat. Inkubationszeit: 15 min.

d) Laktatdehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: Na-dl-lactat. Inkubationszeit: 30 min.

e) Alkoholdehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: Äthanol. Inkubationszeit: 30 min.

f) Glucose-6-phosphatdehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: Glucose-6-phosphat-Na. Inkubationszeit: 30 min.

g) ß-oxybuttersäuredehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: dl-ß-oxybuttersäure (Na-Salz). Inkubationszeit: 30 min.

h) Äpfelsäuredehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: Na-l-maleat. Inkubationszeit: 30 min.

i) Insocitronensäuredehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: dl-Isocitronensäure. Inkubationszeit: 30 min.

k) Succinodehydrogenase nach NACHLAS, WALKER und SELIGMAN (34). Substrat: Na-succinat. Inkubationszeit: 30 min.

l) Glutamatdehydrogenase nach HESS, SCARPELLI und PEARSE (24). Substrat: Na-l-glutamat. Inkubationszeit: 30 min.

m) ß-Glucuronidase nach BURTON und PEARSE (36). Substrat: ß-hydroxyquinolin. Inkubationszeit: 30 min.

n) DPN-Diaphorase nach SCARPELLI, HESS und PEARSE (45). Substrat: DPNH. Inkubationszeit: 15 min.

o) ATP-ase nach WACHSTEIN und MEISEL (36). Substrat: Di-natriumsalz des ATP. Inkubationszeit: 1 h.

p) Saure Phosphatase: 1. Nach GOMORI (17b). Substrat: Bleinitrat. Inkubationszeit: 1 h.
2. nach PEARSE (36). Substrat: alpha-naphthyl-phosphat (Natriumsalz). Inkubationszeit: 30 min.

q) Alkalische Phosphatase: 1. nach GOMORI (17b). Substrat: Calcium-Cobalt. Inkubationszeit: 1 h.
2. Nach PEARSE (36). Substrat: alpha-Naphthyl-phosphat (Natriumsalz). Inkubationszeit: 30 min.

Befunde und Besprechung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigt Tabelle 1. Unterschiedliche Farbintensitätswerte bei ein und derselben Tierart wurden in Mittelwerten zusammengefasst.

Bei allen untersuchten Epithelkörperchen sind positiv die unspezifische Esterase, Laktat-, Äpfelsäure- und Isocitronensäuredehydrogenase, die DPN-Diaphorase, ATP-ase und die saure Phosphatase nach PEARSE (36) und GOMORI (17b). Negativ in jedem Fall waren die Nachweise für ein trypsinähnliches Ferment mit Esteraseaktivität nach GLENNER und COHEN (16), das in dem hier vorliegenden Material nur in menschlichen Mastzellen positiv ist, die Alkohol- und Glutamatdehydrogenase, die ß-Glucuronidase und die alkalische Phosphatase nach GOMORI (17b) und PEARSE (36). Im menschlichen Epithelkörperchen reagieren Cussino- und Äpfelsäuredehydrogenase, ATP-ase und DPN-Diaphorase in eosinophilen Zellen wesentlich stärker als in dunklen und hellen Hauptzellen und kleinen wasserhellen Zellen. Der reiche Mitochondriengehalt der eosinophilen Zellen und ihre auffallend starke Fermentausstattung sind bekannt durch Untersuchungen von PEARSE und TREMBLAY (37b), EDER (11a), LANGE (29) und BALOGH und COHEN (3).

Während die Mehrzahl der in den Epithelkörperchen der verschiedenen Arten nachzuweisenden Enzyme weitgehend übereinstimmt, finden sich bei einigen Enzymen Unterschiede. Diese betreffen die Glucose-6-phosphatdehydrogenase, die unspezifische Esterase, die Isocitronensäuredehydrogenase, die Laktatdehydrogenase und die Succinodehydrogenase. Hier sind die Unterschiede bei den einzelnen Tierarten nicht sehr stark ausgeprägt, so dass es sich vermutlich um geringe quantitative Differenzen handelt. Dagegen zeigt das Ferment LAP ausserordentlich starke Unterschiede. Während im Rattenepithelkörperchen dieses Enzym den grössten Substratumsatz aufweist, ist es im Epithelkörperchen des Menschen und des Goldhamsters auch nach langen Inkubationszeiten histochemisch nicht erfassbar. Beim

	Mensch	Ratte	Goldhamster	Meer-schweinchen
1-Leucylaminopeptidase (LAP)	-	+++	-	+
Trypsinähnliches Ferment mit Esteraseaktivität	-	-	-	-
Unspezifische Esterase	+	(+)	++	(+)
Laktatdehydrogenase	(+)	++	++	++
Alkoholdehydrogenase	-	-	-	-
Glucose-6-ph-dehydrogenase	(+)	(+)	+	-
ß-oxybutters.-dehydrogenase	+	-	(+)	-
Äpfelsäure-dehydrogenase	++	++	++	++
Isocitronens.-dehydrogenase	+	(+)	++	++
Succinodehydrogenase	+	+	+	(+)
Glutamatdehydrogenase	-	-	-	-
ß-Glucuronidase	-	-	-	-
DPN-Diaphorase	++	++	++	++
ATP-ase	+	(+)	+	(+)
Saure Phosphatase (GOMORI)	++	++	++	+
Saure Phosphatase (PEARSE)	++	+	+	(+)
Alkalische Phosphatase (GOMORI)	-	-	-	-
Alkalische Phosphatase (PEARSE)	-	-	-	-

TABELLE 1

Fermentvorkommen in Parenchymzellen unbehandelter Epithelkörperchen. Die Reaktionen für Succinodehydrogenase, Äpfelsäuredehydrogenase, ATP-ase und DPN-Diaphorase sind beim menschlichen Epithelkörperchen nicht in allen Zellen gleich, sondern in eosinophilen Zellen besonders stark. Für diese Tabelle sind beim Menschen die Reaktionen in dunklen und hellen Hauptzellen sowie in kleinen wasserhellen Zellen zugrunde gelegt. Die Reaktionen für alkalische Phosphatase nach GOMORI und PEARSE waren ganz vereinzelt schwach positiv.

Meerschweinchen ist die Reaktion für das Ferment positiv, jedoch wesentlich geringer als beim Rattenepithelkörperchen. Dieser auffallende Unterschied veranlasste zu einer weiteren Prüfung, da dieses Enzym des Eiweissstoffwechsels im Zu-

sammenhang mit der Parathormonsynthese von grosser Bedeutung sein kann. Dem ausserordentlich hohen Substratumsatz der LAP am Rattenepithelkörperchen geht keine entsprechend hohe Aktivität der unspezifischen Esterase parallel. Es scheint sich demnach bei der LAP um eine echte Peptidasewirkung zu handeln und nicht um eine bei Peptidase gelegentlich zu beobachtende Esterasewirkung.

Die LAP ist im menschlichen Epithelkörperchen nur an Gefässabschnitten und in einer Anzahl von Kolloidfollikeln positiv. Nach NACHLAS, PRINN und SELIGMAN (33) kommt die LAP bei der Ratte in zweierlei Formen vor. Eine Komponente (desmo-Komponente) ist an geformte cytoplasmatische Bestandteile (Mitochondrien, Mikrosomen) gebunden, die andere (lyo-Komponente) liegt in löslicher Form vor (56). Ihre Anteile verhalten sich wie 2/3 zu 1/3. Da sich die lyo-Komponente bei der histochemischen Methode dadurch, dass ein grosser Teil in das wässrige Inkubationsmedium diffundiert, weitgehend dem Nachweis in der Zelle entziehen kann, wurde untersucht, ob nicht im menschlichen Epithelkörperchen die LAP vorwiegend als lyo-Enzym vorkommt und deshalb histochemisch nicht nachweisbar ist. Das Gesamthomogenat zweier menschlicher Epithelkörperchen wurde deshalb mit einer colorimetrischen Methode untersucht. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von l-Leucyl-ß-naphthylamid als Ausdruck einer Substratumsetzung eine schwache Rotförbung eintrat, während im Leerversuch ohne Epithelkörperchenhomogenat keine Reaktion stattfand. Gleichzeitig als Homogenat inkubierte und den Epithelkörperchenhomogenaten gewichtsgleiche Nierenrinden und Lebergewebsstückchen zeigten starke Reaktionen, besonders das Nierenhomogenat. Das Lebergewebe reagierte schwächer als das Nierengewebe. Im Epithelkörperchenhomogenat war demgegenüber nur eine sehr geringe Reaktion nachweisbar. Eine in Anlehnung an die histochemische Methodik durchgeführte Chelatbildung mit Kupfersulfat des im Filtrat quantitativ fassbaren Farbniederschlags mit gleichzeitigem Farbumschlag lässt die Reaktionsunterschiede noch deutlicher hervortreten. Da das Homogenat des gesamten Epithelkörperchens inkubiert wurde, ist nicht zu entscheiden, ob die sehr schwache Reaktion auf eine geringe lyo-Komponente von LAP aus dem Epithelkörperchenparenchym oder aus dem kapsulären oder interstitiellen Bindegewebe zurückzuführen ist.

Daraus folgt, dass im menschlichen Epithelkörperchen nicht nur keine histochemisch nachweisbare, als desmo-Enzym angeordnete LAP vorkommt, sondern auch keine oder eine nur sehr geringe lyo-Komponente. Es handelt sich also demnach um einen echten Artunterschied gegenüber dem Rattenepithelkörperchen, in dem sowohl reichlich als desmo-Enzym angeordnete LAP vorkommt, wie auch ein Teil als lyo-Komponente entsprechend den Untersuchungen von NACHLAS, PRINN und SELIGMAN (33).

Der die LAP betreffende Artunterschied ist um so auffallender, als die übrigen Enzyme bei den verschiedenen Tierspecies relativ gleichartig ausfallen. Das bedeutet, dass das Vorkommen dieser Peptidase im Rattenepithelkörperchen auf eine Besonderheit dieser Zellen im Stoffwechsel hinweist, die, soweit aus dem En-

zymbestand ablesbar, nicht die Enzyme des Atmungs- und Energiestoffwechsels betrifft. Auch die in allen Epithelkörperchen stark nachweisbare saure Phosphatase zeigt keinen gekoppelten Unterschied. Auffallend an den übrigen Enzymen ist der in der Regel sehr starke Ausfall der Nachweisreaktionen von Äpfelsäuredehydrogenase und von Isocitronensäuredehydrogenase. Der Vergleich dieser einzelnen Enzymreaktionen ist grundsätzlich sehr problematisch, weil zwar der Reaktionsmechanismus, d.h. die verwandten Substrate und die Zusätze zur Inkubationslösung, und die Reaktionszeit jeweils völlig gleich gehalten sind, die Reaktionskinetik der Enzyme jedoch unterschiedlich ist. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen ist auffallend, dass die Äpfelsäuredehydrogenase und die Insocitronensäuredehydrogenase bei den untersuchten Tierspecies jeweils stark nachweisbar sind, während in anderen Organen diese Enzyme sonst meistens im Rahmen der übrigen DPN-abhängigen Enzyme nicht zu den stärksten Fermenten gehören.

III. FERMENTHISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DER PARATHORMONSYNTHESE

Die physiologische Funktion des Epithelkörperchens, den Calcium-Phosphorspiegel im Organismus zu steuern, lässt sich, nachdem kein direkt übergeordneter hormoneller Steuerungsmechanismus bekannt ist (13), im wesentlichen auf drei Wegen beeinflussen:

1. Über eine chronische Nierenschädigung, die zu einem Absinken des Calcium- oder einen Anstieg des Phosphorspiegels im Blut führt (13, 42a, 42b).
2. Über eine direkte Beeinflussung der Nebenschilddrüse durch Parathormon, das zur Inaktivitätsatrophie des Epithelkörperchens führt (22, 40b).
3. Über die Gabe von Mineralien, die in der Lage sind, ein vorhandenes Calcium-Phosphorgleichgewicht gezielt zu stören (7, 12, 13, 37a, 38, 43).

In den im Folgenden geschilderten Versuchen wird durch subkutane Injektionen von Mineralien von der dritten Möglichkeit Gebrauch gemacht, und zwar durch Injektionen von Ammoniumphosphat zum Zweck der Stimulierung und von Calciumglukonat zur Inaktivierung des Epithelkörperchens. PEARSE und TREMBLAY (37a) inaktivierten das Epithelkörperchen durch das dem Parathormon in seiner Wirkung nahestehende Dihydrotachysterol. Eine Stimulierung wurde durch Gabe von phosphorreicher und Vitamin D-freier Diät erzeugt. Die Verabreichung der Mineralien durch Injektionen hat gegenüber diätetischen Massnahmen den Vorteil, dass hierdurch die Gabe der Mineralien leichter dosierbar ist und die Epithelkörperchenfunktion tiefgreifender beeinflusst wird.

Beobachtungsgut

17 männliche Ratten aus institutseigener Zucht, zu Beginn des Versuchs zwischen 160 und 180 g schwer, mit normaler Stallkost ernährt.

Gruppe A: 12 Tiere
Untergruppen: A_1, A_2, A_o.
A_1: 4 Tiere erhielten 25 Tage lang täglich 0,5 ml 5 %iges Ammonphosphat s.c. unter die Rückenhaut injiziert.
A_2: 4 Tiere erhielten 25 Tage lang täglich 1 ml 2 %iges Calciumgluconat s.c.
A_o: 4 unbehandelte Tiere dienten zur Kontrolle.

Gruppe B: 5 Tiere erhalten 14 Tage tgl. 0,2 ml Fe-III-Glycerophosphat (0,183 g/ml H_2O) s.c., anschliessend 9 Tage 2 %iges Ammonphosphat als Trinkwasser, für 42 Tage 0,5 ml 2 %-iges Ammonphosphat, 27 Tage Pause, erneut 41 Tage 0,5 ml Ammonphosphat und 17 Tage 0,5 ml 4 %-iges Ammonphosphat + 0,2 ml Fe-III-Glycerophosphat, 29 Tage Pause, 97 Tage Stimulierung mit tgl. 0,5 ml 4 %-igem Ammonphosphat abwechselnd mit 0,2 ml Fe-III-Glycerophosphat, 16 Tage Pause, 119 Tage Stimulierung mit Steigerung der tgl. Injektion auf 5 %-iges Amonphosphat. Ein Tier gestorben, 4 Tiere nach Abschluss der Behandlung getötet. Gewicht am Ende des Versuchs 360 g.

Methode

Anfertigung der Schnitte wie in Kapitel I. - LAP-Darstellungsmethode nach NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (32) wie oben. Messung der Fermentaktivität: Um aus der im Prinzip nicht quantitativen histochemischen Methodik wenigstens ungefähre Anhaltspunkte über quantitative Substratumsetzungen zu erhalten, werden nach Art biochemischer Messungsvorgänge zeitlich gestaffelte Untersuchungsreihen mit Ablesungen zu verschiedenen Zeitpunkten aufgestellt. Die Reihe der Ablesungspunkte beginnt mit dem Zeitpunkt, an dem die ersten Fermentreaktionen sichtbar werden. Dies ist in der Regel nach 3 min Inkubationszeit der Fall. Der Endpunkt der Ablesung entspricht der Zeit nach der das unbehandelte, nativ untersuchte Epithelkörperchen eine maximale LAP-Reaktion erreicht hat; er liegt bei 36 min. Die Inkubationszeit von 36 min liegt wesentlich unter der an den meisten anderen Organen einzuhaltenden Inkubationszeit, da die LAP im Rattenepithelkörperchen ausserordentlich reich enthalten ist. Die Kürze der Inkubationszeit bringt den Vorteil mit sich, dass Diffusionserscheinungen nur minimal sind und keine unkontrollierten Enzyminhibierungen entstehen.

Zwischen den den Inkubationszeiten von 3 und 36 min entsprechenden Ablesungspunkten wird bei 6, 12, 18 und 24 min Inkubatior abgelesen. Auf diese Weise bilden 6 Serienschnitte jedes Versuchstieres eine Untersuchungsreihe, die infolge ihrer Zusammensetzung aus zeitlich gestaffelten Inkubationszeiten eine gute Möglichkeit bietet, vergleichende Aussagen über den LAP-Substratumsatz der einzelnen Versuchstiere zu machen. Die Farbniederschläge der LAP-Reaktion als Mass

für den Substratumsatz wurden nach makroskopischer Beurteilung der Stärke der Farbreaktionen entsprechend in eine Farbskala eingeordnet. Die Werte der Skala beginnen mit 0 = keine Farbreaktion und führen über (+) = eben wahrnehmbar, (+), +, +(+), ++, ++(+) und +++ zu +++(+).

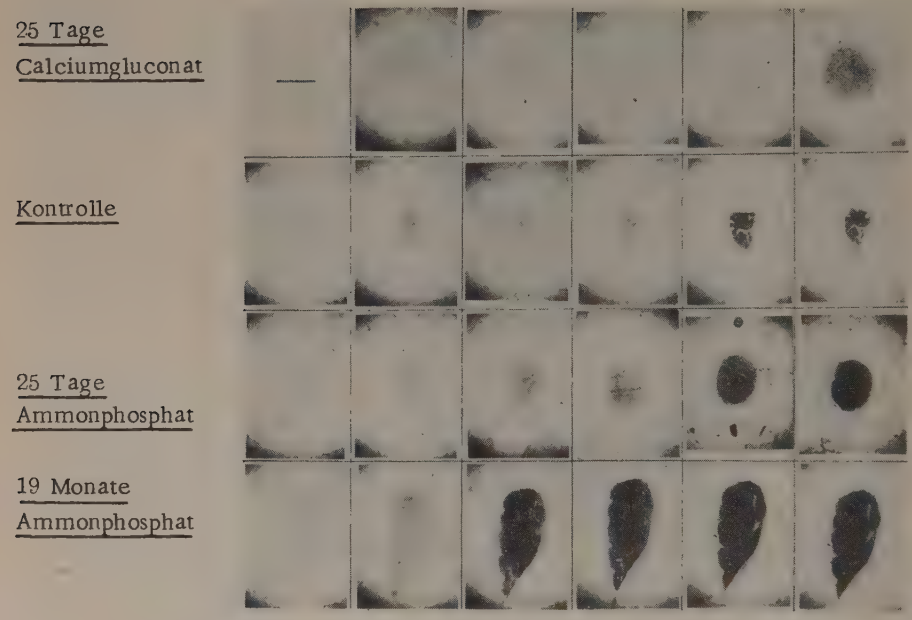


ABBILDUNG 1

Reaktion für LAP in Rattenepithelkörperchen nach zeitlich gestaffelten Inkubationszeiten. Abgebildet sind die jeweils 3, 6, 12, 18, 24 und 36 min inkubierten Nativschnitte je eines Tieres, das 25 Tage mit Calciumgluconat (A_2), unbehandelt blieb (A_0), bzw. 25 Tage (A_1) und 19 Monate (B) mit Ammonphosphat behandelt wurde. Die makroskopisch beurteilte Farbstärke als Mass für die LAP-Substratumsetzung des durch Calciumgluconat ruhiggestellten Epithelkörperchens (A_2) liegt deutlich unter den entsprechenden Werten des unbehandelten Tieres (A_0) und der 25 Tage (A_1) bzw. 19 Monate (B) phosphatstimulierten Epithelkörperchen. - Die Grössenzunahme ist lediglich bei dem 19 Monate phosphatstimulierten Epithelkörperchen (B) reell. Die Grössendifferenz bei den übrigen Epithelkörperchen beruht auf unterschiedlichen Schnittebenen.

Befunde

In Abb. 1 sind aus jeweils sechs Serienschnitten sich zusammensetzende Untersuchungsreihen von Tieren abgebildet, die unbehandelt blieben (A_0), 25 Tage mit Calciumgluconat (A_2), 25 Tage mit Ammoniumphosphat (A_1) und 19 Monate mit Ammoniumphosphat und Fe-III-Glycerophosphat (B) behandelt wurden.

Die makroskopisch beurteilten Werte der histochemisch erfassten LAP-Substratumsetzung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die dort eingetragenen Farbintensitätswerte als Massstab für die Substratumsetzung einzelner Tiere einer Gruppe zu einem bestimmten Ablesungspunkt sind in Abb. 2 zu Gruppenwerten summarisch zusammengefasst und in ein Koordinatensystem eingetragen.

Wie Abb. 1 zeigt, liegt die Höhe der LAP-Substratumsetzung der 25 Tage mit Calciumgluconat behandelten Epithelkörperchen (A_2) deutlich unter den entsprechenden Werten der Kontrolltiere (A_0) bzw. der 25 Tage mit Ammoniumphosphat (A_1) und 19 Monate mit Ammoniumphosphat und Fe-III-Glycerophosphat stimulierten Epithelkörperchen (B). Bei den mit Calciumgluconat inaktivierten Epithelkörperchen (A_2) ist teilweise nach 3 min noch keine histochemisch erfassbare LAP-Substratumsetzung feststellbar. Der höchste Wert, den die 25 Tage mit Calciumgluconat inaktivierten (A_2) und die unbehandelten Epithelkörperchen (A_0) nach 36 min Inkubationszeit mit ++(+) erreichen, findet sich bei den 19 Monate stimulierten (B) nach 6 min und bei den 25 Tage stimulierten Epithelkörperchen (A_1) nach 18 min Inkubationszeit. Ein 19 Monate stimuliertes Epithelkörperchen (B) erreicht nach 18 min mit +++(+) den höchsten Wert der Skala. Aus Abb. 1 geht hervor, dass die Grösse des 19 Monate phosphatstimulierten Epithelkörperchens (B) wesentlich über derjenigen der nur 25 Tage phosphatstimulierten (A_1) bzw. unbehandelten (A_0) und 25 Tage mit Calciumgluconat (A_2) inaktivierten Epithelkörperchen liegt. Der Grössenunterschied ist lediglich bei den 19 Monate phosphatstimulierten Epithelkörperchen (B) reell. Die Grössendifferenz bei den inaktivierten (A_2), unbehandelten (A_0) und kurz stimulierten (A_1) Epithelkörperchen ist auf unterschiedliche Schnittebenen zurückzuführen.

Inkubationszeit	25 Tage Calciumglukonat (A_2)	Kontrolltiere (A_o)	25 Tage Ammoniumphosphat (A_1)	19 Monate Ammoniumphosphat (B)
3 min	0	(+)	(+)	(+)
	0	(+)	(+)	(+)
	(+)	(+)	(+)	+
	(+)	(+)	(+)	+(+)
6 min	(+)	(+)	(+)/(+)	(+)
	(+)	(+)	(+)/(+)	+
	(+)	(+)	+	+(+)
	(+)	(+)	+(+)	++(+)
12 min	(+)	(+)	(+)/+	+
	(+)	+	(+)/+	+/+(+)
	++(+)	+	+(+)	++
	++(+)	+	+(+)/++	+++
18 min	(+)	(+)/+	+	+++(+)
	(+)/+	+(+)	+(+)	++(+)
	+/+(+)	+(+)	+(+)/++	++
	+(+)	+(+)	++(+)	++
24 min	(+)/(+)	+(+)	++	++
	+(+)	+(+)	++	++(+)
	+(+)	++	++(+)	+++(+)
	++	++	+++	+++(+)
36 min	+	+(+)	+	+++
	+(+)/++	++	++(+)/+++	+++
	++/++(+)	++(+)	+++(+)	+++(+)
	++(+)	++(+)	+++(+)	+++(+)

TABELLE 2

LAP-Substratumsatz in Rattenepithelkörperchen. Die makroskopisch beurteilten Farbintensitätswerte der histochemischen LAP-Reaktion als Mass für die Substratumsetzung der 3, 6, 12, 18, 24 und 36 min inkubierten Nativschnitte von je 4 Tieren, die unbehandelt blieben (A_o), 25 Tage mit 2 %-igem Calciumgluconat (A_2), 25 Tage mit 5 %-igem Ammoniumphosphat (A_1) und 19 Monate mit ansteigenden Konzentrationen von Ammoniumphosphat und Fe-III-Glycerophosphat (B) behandelt wurden. Die Werte der 19 Monate (B) bzw. 25 Tage (A_1) mit Ammoniumphosphat behandelten Epithelkörperchen liegen deutlich über denen der unbehandelten (A_o) und der 25 Tage mit Calciumgluconat inaktivierten Epithelkörperchen (A_2).

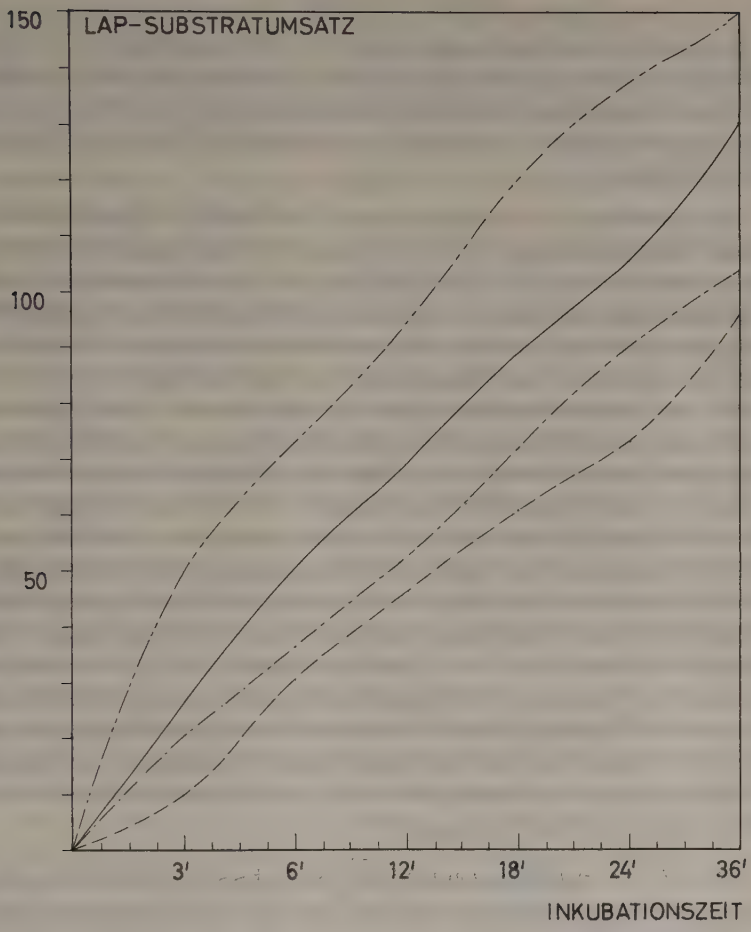


ABBILDUNG 2

LAP-Substratumsatz in Rattenepithelkörperchen. Die in Tabelle 2 eingetragenen Farbintensitätswerte als Mass für die LAP-Substratumsetzung einzelner Tiere einer Gruppe zu einem bestimmten Ablesungspunkt sind in Gruppenwerten summarisch zusammengefast und in ein Koordinatensystem eingetragen (..--..: 19 Monate Ammoniumphosphat (B); _____: 25 Tage Ammoniumphosphat (A_1); .-.-.-: Kontrolle (A_0); ------: 25 Tage Calciumgluconat (A_2)). Der Substratumsatz der mit Calciumgluconat ruhiggestellten Epithelkörperchen (A_2) liegt deutlich unter, derjenige der 25 Tage (A_1) bzw. 19 Monate (B) phosphatstimulierten Epithelkörperchen deutlich über dem der Kontrolltiere (A_0).

Besprechung

Wie die Befunde ergeben, geht einer Stimulierung der Funktion von Rattenepithelkörperchen eine histochemisch erfassbare Erhöhung und einer Dämpfung der Funktion eine Erniedrigung des LAP-Substratumsatzes parallel. Danach ergibt sich die Frage, ob und welcher Zusammenhang zwischen dem Enzym LAP und dem Parathormon besteht.

Das Parathormon ist ein Eiweisskörper, der Tyrosin, Tryptophan und Histidin enthält, ohne Beimischung von NS und einem Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 275 mμ (1, 9, 18, 21, 55, 43). Der Eiweisskörper wird von Verdaungsfermenten rasch zerstört und ist in 80 %-igem Alkohol löslich (30a). Von hochgereinigten Nebenschilddrüsenextrakten sind durch Ultrazentrifuge zwei Eiweisskörper abtrennbar, von denen der eine ein Molekulargewicht von 15 000 bis 25 000, der andere ein Molekulargewicht von 500 000 besitzt. ROSS und WOOD (41) und l'HEUREUX und Mitarb. (25) haben gezeigt, dass der hochmolekulare Eiweisskörper inersekretorisch inaktiv und der niedermolekulare innersekretorisch aktiv ist. GREEP und KENNY (22) fanden, dass sich die Wirkung des Parathormons auf den Knochen von der auf die Niere trennen lässt. DAVIES (10) und GORDON (19) diskutierten die Möglichkeit, dass entweder zwei verschiedene Hormonmoleküle mit zwei verschiedenen biologischen Aktivitäten vorliegen oder nur ein Hormonmolekül mit einem Phosphatdiuresefaktor und einem ossären Angriffsfaktor (Hypercalcaemiefaktor). Auf Grund der Tatsache, dass Extrakte mit bevorzugt der einen und bevorzugt der anderen Wirkungskomponente bei der Elektrophorese im gleichen Feld liegen, nehmen GORDON (18) und DAVIES (10) an, dass es sich um ein Hormonmolekül mit zwei verschiedenen Wirkungsgruppen handelt.

Ein spezifischer histochemischer oder spektrographischer Nachweis des Hormons ist bis heute noch nicht gelungen.

Die LAP wird erstmalig von LINDERSTRÖM-LANG erwähnt (31). Es handelt sich um ein in Mikro- und Makroorganismen der Tier- und Pflanzenwelt weitverbreitetes Ferment. Bekannt ist sein Vorkommen in der Darmschleimhaut der meisten Tiere und in zahlreichen tierischen Geweben (14, 15, 32, 36, 48a).

Wie alle Peptidasen ist die LAP ein Metalproteid. Um seine höchste Aktivität zu erreichen, bedarf es der Anwesenheit von Mn- und Mg-Ionen (30b, 32, 49a, 52). Aus der Tatsache, dass das Ferment -seine kristalline Reindarstellung gelang bis heute nicht- durch Citrat und Versen (Äthylen-diamin-tetraazetat) stark gehemmt wird, sich diese Hemmung aber bei mit Mn-Ionen aktiviertem Ferment nicht auswirkt, schliesst man, dass es Mg-Ionen als Molekülbestandteil enthält (30b). Während Natriumcitrat die Aktivität bis auf 50 % herabsetzt, hemmt Äthylen-diamin-tetraazetat meist vollständig (32).

Die LAP stellt eine Exopeptidase dar, d.h. sie greift nur eine Peptidbindung an, die den endständigen Aminosäurerest mit dem Eiweissmolekül verbindet. Das zu spaltende Peptid muss als endständige Aminosäure Leucin mit freier alpha-Ami-

nogruppe besitzen (30b, 32).

Je nach Tierart, Gewebe, Anwesenheit eines aktivierenden Metallions, nach Art des verwendeten Substrats und der angewandten Methode schwanken die Angaben über das ph-Optimum der LAP. Bei colorimetrischer Methode, Rattengewebe als Enzymquelle und l-Leucyl-ß-naphthylamidhydrochlorid als Substrat finden FOLK und BURSTONE (14) ein ph-Optimum von 7,0 bis 7,4, GREEN und Mitarb.(19) ein Optimum von 8,0. Diesen Wert ergaben auch die Untersuchungen von NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (32).

Beim Versuch, die LAP aus tierischen Organextrakten in möglichst reiner Form zu erhalten, stellten SMITH und BERGMANN (49b) bei Extrakten von Schweineschleimhaut und menschlichem Uterus fest, dass auch bei zunehmender Reinigung der Extrakte Dipeptide gespalten werden, jedoch Tripeptide wie Leucylglycylglycin einen verminderten Umsatz aufweisen. Ob ein zusätzliches Ferment für leucinhaltige Tripeptide anzunehmen ist, das im vorliegenden Fall durch den Reinigungsvorgang der Extrakte inaktiviert wurde oder verloren ging, oder aber ob in dem untersuchten Uterusgewebe eine spezifische Dipeptidase wirksam war, welche mit der eigentlichen LAP nicht identisch ist, blieb bis heute unklar. Es konnte nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob die LAP ausser Dipeptiden auch Tri- oder Polyaminopeptide spaltet. Ein weiteres Problem stellt sich hinsichtlich der Spezifität der LAP zu Leucinpeptiden. SMITH und Mitarb. (50) stellten fest, dass hochgereinigte Organextrakte dl-Norvalinamid, dl-alpha-Aminobutyrylamid, l-Tryptophanamid und l-Alaninamid spalten. Für diese Tatsache gibt es zwei Deutungen: entweder spaltet das Enzym nicht spezifisch Leucinverbindungen oder aber in den gereinigten Organpräparaten von SMITH und Mitarb. (50) fanden sich neben der LAP noch andere Enzyme, welche selbst durch feine Trennungsmethoden von der LAP nicht getrennt werden konnten. Es werden von hochgereinigten LAP-Präparaten nur solche Leucinpeptide gespalten, bei welchen die Aminogruppe des Leucins frei ist. Die Substitution an dem die Aminogruppe tragenden C-Atom durch weitere Radikale hat auf die Spaltung nur geringen Einfluss.

Wenn auch die Frage, ob die LAP ausser Dipeptiden auch Tri- und Polypeptide spaltet und ob die zu spaltenden Peptide Leucin enthalten müssen, heute nicht eindeutig beantwortet werden kann, so wird doch allgemein anerkannt, dass das einzige heute bekannte Ferment, welches Leucinamid spaltet, die LAP darstellt. Aus diesen Gründen verwenden FOLK und BURSTONE (14) als histochemisches Substrat l-Leucyl-ß-naphthylamidhydrochlorid.

Nach BERGMANN (5) können Peptidasen, darunter auch die LAP, sowohl hydrolytisch wie auch synthetisch wirksam werden. Eine Peptidsynthese ist möglich, wenn das Gleichgewicht der Reaktion von beiden Seiten erreicht werden kann, wenn die Synthese dem Gefälle der freien Energie nicht entgegengerichtet ist. Bei der Spaltung von Peptiden liegt das Reaktionsgleichgewicht stark auf der Seite der Hydrolyse. Soll die Synthese stattfinden, darf sich das Produkt der Synthese nicht anreichern, da eine Anreicherung das Reaktionsgleichgewicht im Sinne der Spaltung verschieben würde. Eine niedrige Konzentration des Syntheseproduktes würde

dadurch erreicht, dass dieses sofort weiterreagiert, auskristallisiert oder unlöslich ist.

Modellfälle einer Peptidsynthese stellen die Bildung von Benzoyl-l-leucinanilid aus Benzoyl-l-leucin und Anilin durch Einwirken von Papain und die Synthese von Benzoyl-l-leucyl-l-leucin-anilid aus Benzoyl-l-leucin und l-Leucinanilid durch mit HCN aktiviertem Papain dar (30b).

Nach diesen Befunden muss neben der hydrolytischen auch eine synthetische Wirkung der LAP in Betracht gezogen werden. Die Bedeutung hydrolytischer und synthetisierender Enzymwirkung im Epithelkörperchen wurde von SANDRITTER, FEDERLIN und GERATZ (43) im Zusammenhang mit der Bildung des Parathormons herausgestellt. Sie kamen dabei zu der Arbeitshypothese, dass in den hellen Hauptzellen unter Mitwirkung von RNS hochmolekulare Cytoplasmaeiweisskörper aufgebaut werden. Diese hochmolekularen Cytoplasmaeiweisskörper seien eine Hormonvorstufe, aus der die niedermolekulare, innersekretorisch aktive Hormonkomponente entstehe. Ähnlich wie bei der Schilddrüse, wo bei der Resorption des hochmolekularen Kolloids einweissspaltende Fermente einwirken (40a), nehmen die Autoren an, dass die Überführung der hochmolekularen Eiweisskörper in die aktive Hormonkomponente durch proteolytische Fermente erfolgt. Da in dem Cytoplasma der hellen Hauptzellen eine Aufhellung in der Cytoplasmasubstanz zuerst perinucleär auftritt, diskutieren die Autoren als Produktionsstätte dieser proteolytischen Fermente den Zellkern.

Erstmalig haben PEARSE und TREMBLAY (37a) das seinerzeit einzige histochemisch fassbare Enzym des Proteinstoffwechsels, die LAP, vergleichend mit colorimetrischen Messungen am Rattenepithelkörperchen untersucht. Sie erzeugten eine Epithelkörperchenstimulierung durch eine 18-21 Tage dauernde calciumarme, Vitamin D-freie und phosphorreiche Diät und eine Dämpfung der Aktivität durch eine 15-21-tägige Dihydrotachysterolbehandlung. Dabei beobachteten sie, dass in den stimulierten Epithelkörperchen die Substratumsetzung der LAP gegenüber Kontrolltieren anstieg, während die Umsetzung in den innersekretorisch ruhig gestellten Epithelkörperchen gegenüber Kontrolltieren abfiel. Auf Grund dieser Befunde nahmen PEARSE und TREMBLAY (37a) an, dass die LAP, falls sie hydrolytisch wirkt, das aktive Hormon von seiner Trägerkomponente spaltet, wobei das Hormon oder der hormonfreie Träger als endständige Aminosäure Leucin besitzen müsse. Eine mögliche synthetische Wirkung der LAP wird offen gelassen. PEARSE und TREMBLAY (37a) nehmen demnach eine Funktion der LAP im Rahmen der Bereitstellung des Parathormons an, wie sie SANDRITTER, FEDERLIN und GERATZ (43) in ihrer Arbeitshypothese über die Parathormonsynthese für die von ihnen postulierten proteolytischen Fermente diskutieren. Wie die eigenen Untersuchungen gezeigt haben, ist nach langdauernder Stimulierung der Epithelkörperchenfunktion eine erhebliche Zunahme der Enzymkapazität, gemessen an Substratumsatz, feststellbar. Eine kurzdauernde Stimulierung führt gleichfalls zu einer Erhöhung der Enzymkapazität, jedoch wesentlich geringer. Damit stimmt überein, dass eine Blockierung der Epi-

thelkörperchentätigkeit durch Hypercalcaemie zu einem deutlich geringeren Substratumsatz führt als bei den unbehandelten Kontrolltieren.

Auf Grund dieser Befunde liegt es nahe, einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Substratumsetzung der LAP und der gesteigerten Zelleistung der Epithelkörperchenzellen durch die Phosphatstimulierung anzunehmen. Es ergibt sich hierbei jedoch die Frage, welcher Angriffsort der LAP im Rahmen der gesteigerten Stoffwechselleistung zukommt. PEARSE und TREMBLAY (37a) verlegen ihn, wenn das Ferment hydrolytisch wirkt, auf die unmittelbare Hormonvorstufe. Berücksichtigt man jedoch die Befunde von SMITH (48a, 48b) und die Tatsache, dass von der LAP nur mit einiger Sicherheit angenommen wird, dass sie Leucinamid als einziges Ferment spaltet, kann der Deutung von PEARSE und TREMBLAY (37a) nicht ohne weiteres gefolgt werden. Auch die Forderung, dass das zu spaltende Molekül Leucin als endständige Aminosäure enthalten muss, ist zwar durch viele Untersuchungen berechtigt, kann aber nicht absolut gestellt werden, da, wie oben ausgeführt, durch hochgereinigte LAP-Praeparate auch nicht leucinhaltige Peptide gespalten werden.

Auf Grund dieser und der eigenen Befunde ist es naheliegend anzunehmen, dass die LAP auf einer niedrigen Stuffe des Eiweissstoffwechsels eingreift, wobei das Reaktionsprodukt wahrscheinlich in die Hormonsynthese mündet. Dass das Substrat Leucin als endständige Aminosäure besitzen muss, kann nicht mit aller Ausschliesslichkeit gefordert werden. Es ist durchaus vorstellbar, dass das Ferment durch den Reiz zu erhöhter Zelleistung möglicherweise die Synthese von Dipeptiden katalysiert, die dann in die Hormonsynthese eingehen. Dabei muss, falls es sich mit Leucinpeptiden umsetzt, gefordert werden, dass deren Aminogruppe frei ist.

Bei den Epithelkröperchen der 19 Monate phosphatstimulierten Tiere (B) ist gegenüber den unbehandelten (A_0), durch Calciumgluconat inaktivierten (A_2) und 25 Tage phosphatstimulierten Tiere (A_1) eine deutliche Grössenzunahme feststellbar (Abb. 1). Die Vergrösserung geht weit über die Grössenzunahme durch das im Zeitraum des Versuchs erfolgte physiologische Wachstum hinaus. Sie stellt eine Anpassungshyperplasie im Sinn BÜNGELERS (6) dar. Dabei auftretende Probleme im Zusammenhang mit diffusen und herdförmigen Wachtstumsreaktionen und die Fermentausrüstung der Hyperplasie wurden in neuerer Zeit von EDER (11a, 11b), LANGE (29) und BALOGH und COHEN (3) untersucht.

Fasst man das Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen zusammen, so zeigt sich, dass die Aktivität der im Rattenepithelkörperchen histochemisch nachweisbaren LAP eindeutig mit dem Funktionszustand der Zellen zusammenhängt. Nachdem sich jedoch an Epithelkörperchen anderer Species keine vergleichbaren Aktivitäten, bzw. überhaupt keine LAP nachweisen lässt, scheint das Enzym lediglich im Rattenepithelkörperchen, nicht jedoch generell mit der Bereitstellung des Parathormons zusammenzuhängen. Wahrscheinlich greift die LAP auf einer niedrigen Stufe der

Bereitstellung des Parathormons an. Diese Annahme liegt auch auf Grund der Tatsache nahe, dass die Zusammensetzung des Parathormons betreffende Artunterschiede bis heute nicht bekannt sind.

IV. FERMENTCYTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI EXPERIMENTELLER BELASTUNG

Nachdem sich bei chronischer Stimulierung am Rattenepithelkörperchen eindeutige quantitative Beziehungen zwischen Funktionszustand und Fermentkapazität fanden, war zu untersuchen, ob und wie sich die Enzymverteilung der Zelle bei einmaliger Stimulierung verändert. Die Untersuchungen über Veränderungen des Enzymbildes nach einmaliger Phosphatstimulierung werden durch solche nach chronischer Stimulierung ergänzt.

Beobachtungsgut

25 männliche Ratten, aus institutseigener Zucht, zwischen 160 und 180 g schwer, mit normaler Stallkost ernährt.

Gruppe C: 20 Tiere

Untergruppen: C_2, C_3, C_{10}, C_{30}, C_o.

C_2, C_3, C_{10}, C_{30}: je 4 Tiere dieser Untergruppen erhielten 1,5 ml 5 %-iges Ammonphosphat in die Schwanzvene injiziert und wurden 2 min (C_2), 3 min (C_3), 10 min (C_{10}) und 30 min (C_{30}) nach der Injektion getötet.

C_o: 4 Tiere dienten zur Kontrolle.

Gruppe B: 5 Tiere. Versuchsanordnung s.S.13.

Methode

Herstellen der Schnitte und LAP-Darstellungsmethode nach NACHLAS, CRAWFORD und SELIGMAN (32) wie oben.

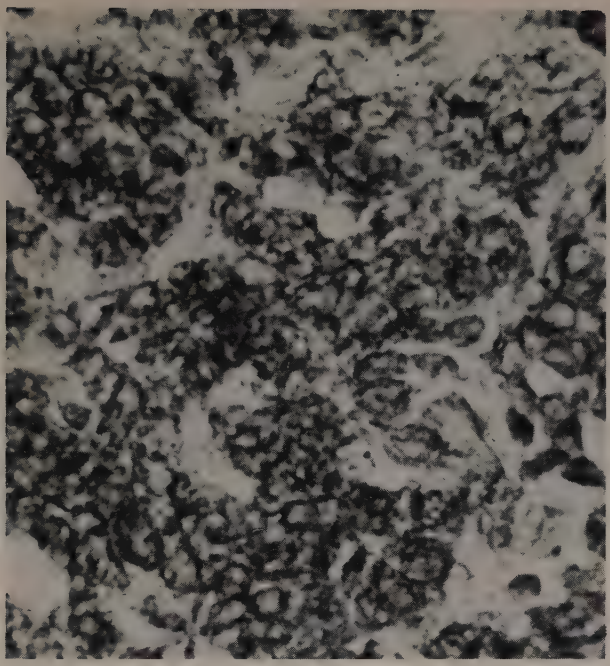


ABBILDUNG 3

LAP-Reaktion in unbehandelten Rattenepithelkörperchen (C_0). Teils diffuse, teils fein-granuläre, über Cytoplasma und Kern verteilte Fermentreaktion mit einer Aufhellung im Kernzentrum und verdichteter Reaktion an der Kern-Plasmagrenze (Vergr. 480 x).

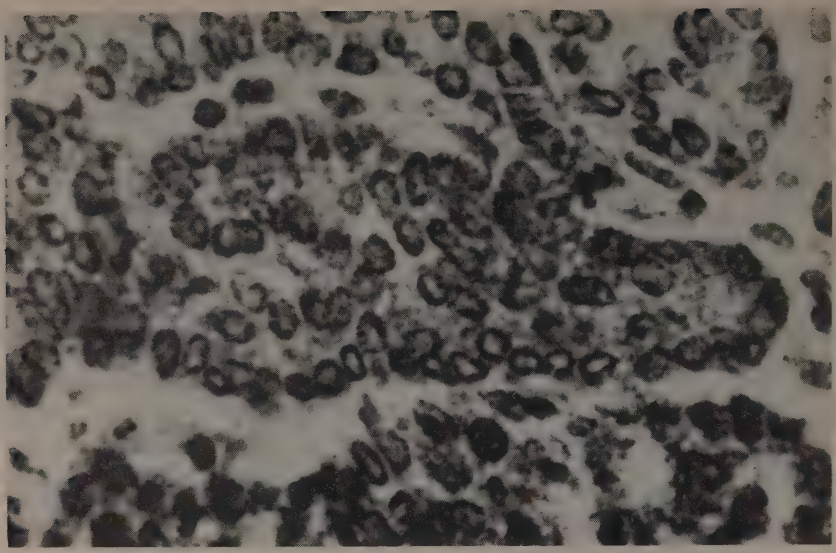
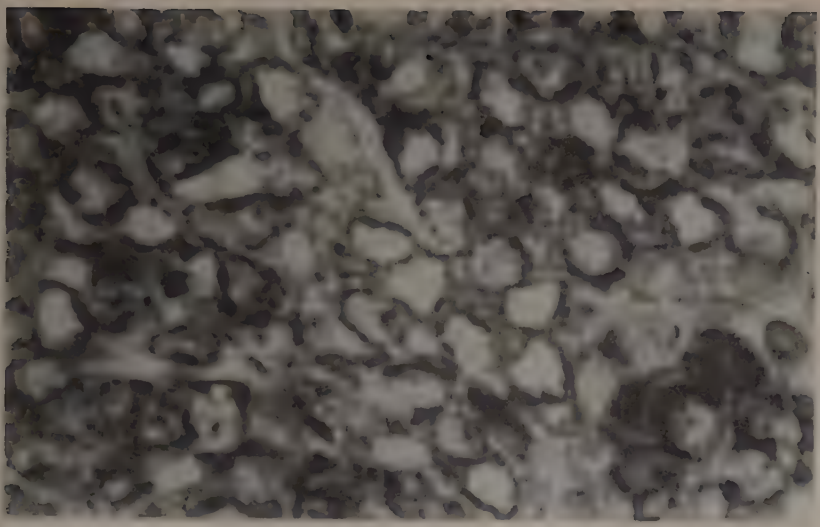
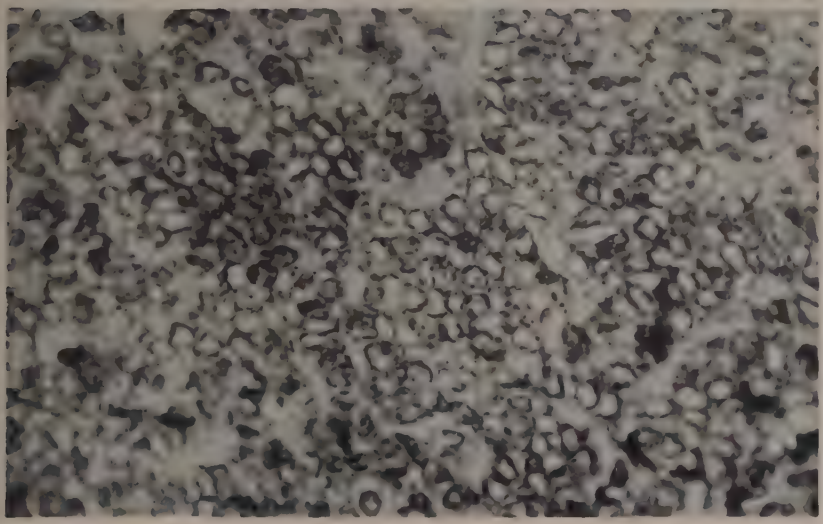


ABBILDUNG 4

LAP-Reaktion in Epithelkörperchen einer 2 min nach einmaliger Phosphatinjektion getöteten Ratte (C_2). Noch zahlreiche Zellen wie bei C_0. In der Mitte des Bildes in einem Zellband von der Umgebung abgegrenzte Reaktion mit deutlich vergrösserter Aufhellung des Kernzentrums (Vergr. 750 x).



b



a

ABBILDUNG 5a + b

LAP-Reaktion im Epithelkörperchen einer 3 min nach einmaliger Phosphatinjektion getöteten Ratte (C_3). In der Mehrzahl der Zellen deutliches Ausbleiben der Fermentreaktion im Kern und Verdichtung der Fermentreaktion an der Kern-Plasmagrenze (Vergr. 480 und 1200 x).

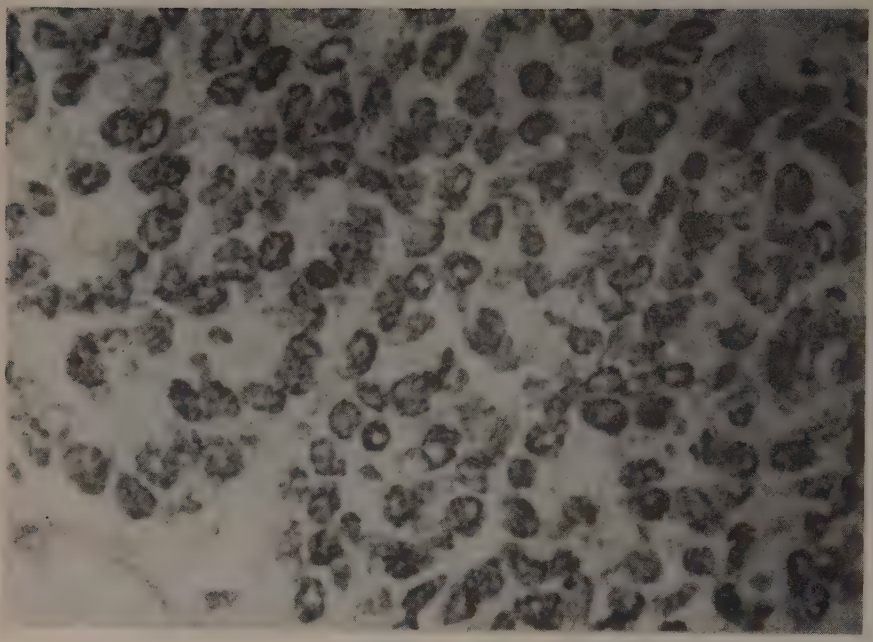


ABBILDUNG 6a

LAP-Reaktion in Rattenepithelkörperchen 10 min nach einmaliger Phosphatstimulierung (C 10). Zunehmende Verlagerung der Fermentreaktion in den Kern und deutliche Vergrösserung der Granula gegenüber den unbehandelten (C_0), 2 min (C_2) und 3 min (C_3) phosphatstimulierten Epithelkörperchen (Vergr. 800 x).

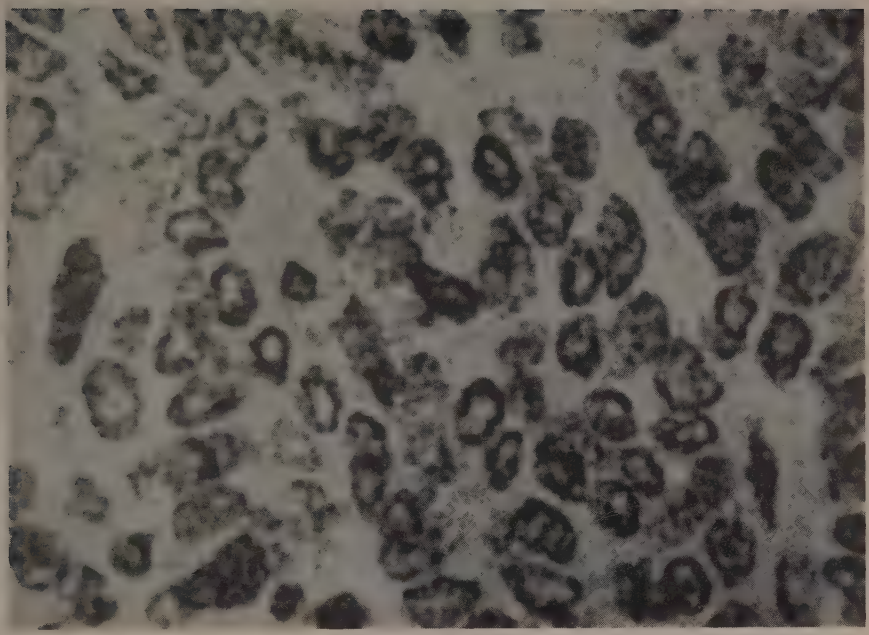


ABBILDUNG 6b

LAP-Reaktion in Rattenepithelkörperchen 10 min nach einmaliger Phosphatstimulierung (C_{10}). Zunehmende Verlagerung der Fermentreaktion in den Kern und deutliche Vergrösserung der Granula gegenüber den unbehandelten (C_0), 2 min (C_2) und 3 min (C_3) phosphatstimulierten Epithelkörperchen (Vergr. 1200 x).

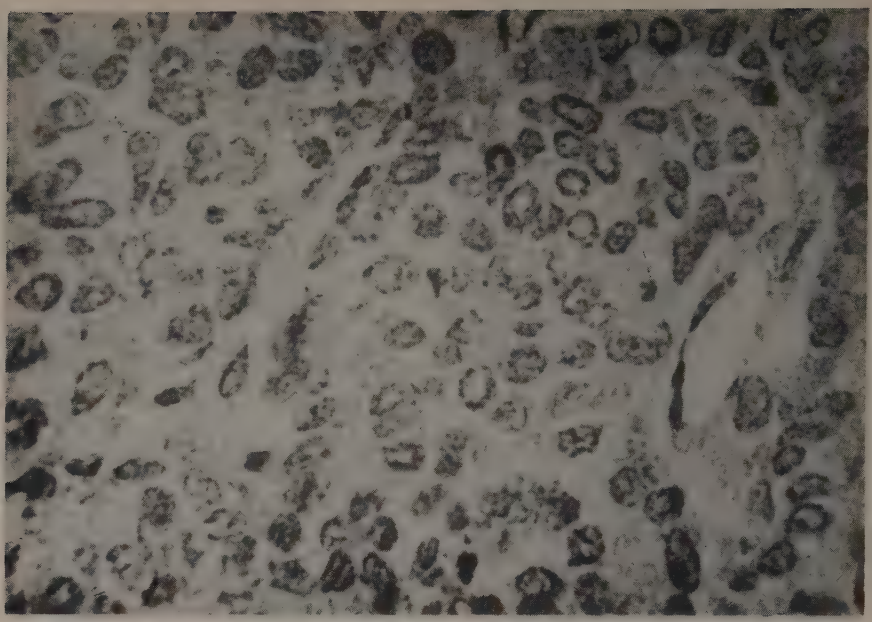


ABBILDUNG 7a

LAP-Reaktion in Epithelkörperchen einer 30 min nach einmaliger Phosphatinjektion getöteten Ratte (C_{30}); wie bei 10 min stimulierten Epithelkörperchen (C_{10}) zunehmende Verlagerung der Fermentreaktion in den Kern und Vergrösserung der fermentpositiven Granula (Vergr. 800 x).

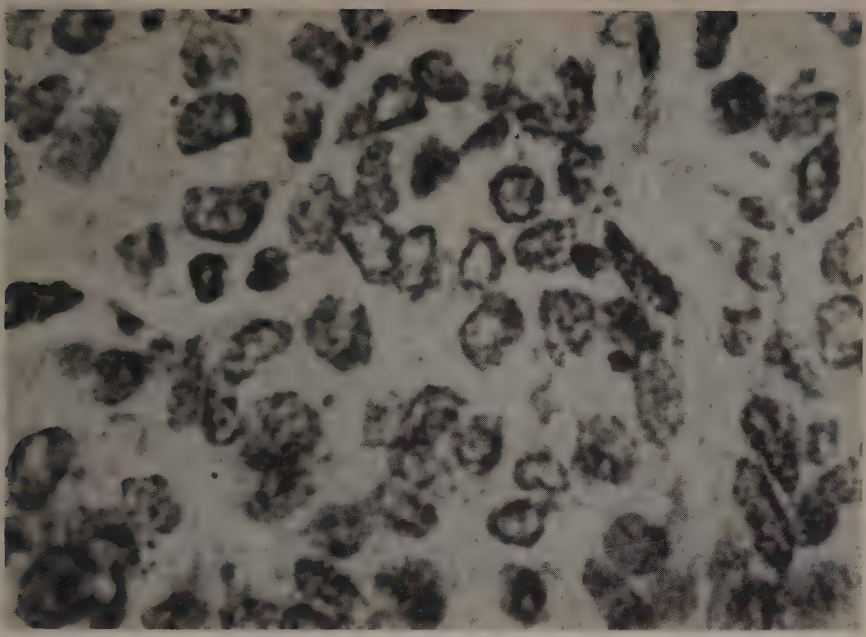


ABBILDUNG 7b

LAP-Reaktion in Epithelkörperchen einer 30 min nach einmaliger Phosphatinjektion getöteten Ratte (C_{30}); wie bei 10 min stimulierten Epithelkörperchen (C_{10}) zunehmende Verlagerung der Fermentreaktion in den Kern und Vergrösserung der fermentpositiven Granula (Vergr. 1200 x).

Befunde

Die unbehandelten Epithelkörperchen (C_0) zeigen eine teils diffuse, teils fein granuläre, über Kern und Cytoplasma verteilte Fermentreaktion mit einer Aufhellung im Kernzentrum und einer verstärkten Reaktion an der Kern-Plasmagrenze (Abb. 3). Die 3 min unter Phosphateinfluss stehenden Epithelkörperchen (C_3) unterscheiden sich davon deutlich. Die Mehrzahl der Zellen lässt im Kernzentrum keine Reaktion erkennen. An der Kern-Plasmagrenze finden sich dichte fermentpositive Granula. Im Cytoplasma tritt eine ähnlich diffuse Reaktion wie bei den Kontrolltieren auf (Abb. 5).

Hinsichtlich ihrer Enzymverteilung in Kern und Cytoplasma stellen die 2 min phosphatstimulierten Tiere (C_2) einen Übergang dar von den Kontrolltieren (C_0) zu den 3 min stimulierten Tieren (C_3). Es finden sich noch zahlreiche Zellen, die keine Veränderungen gegenüber dem Kontrollbild aufweisen. Stellenweise sind aber bereits Enzymverteilungen wie bei den 3 min stimulierten Epithelkörperchen festzustellen. Ein derartiger Befund ist in Abb. 4 dargestellt. Es handelt sich hierbei um ein typisches Beispiel einer lokal begrenzten Reaktion, wie sie am funktionell belasteten Epithelkörperchen relativ häufig anzutreffen ist.

Nach 10 min (C_{10}) ist das Enzym vorwiegend granulär angeordnet. Auffällig ist dabei eine zunehmende Verlagerung der Reaktion in den Kern und eine stärkere Verdichtung der Reaktion an der Kern-Plasmagrenze. Dabei bleibt häufig das Zentrum des Kerns unbeteiligt (Abb. 6). Diese Granula sind gegenüber 2 und 3 min stimulierten Epithelkörperchenzellen dichter gelagert und grösser.

Das Enzymbild von 30 min stimulierten Epithelkörperchen (C_{30}) entspricht weitgehend dem von 10 min stimulierten Tieren (Abb. 7). Bei den 19 Monate phosphatstimulierten Tieren (B) findet sich im Kern eine Granulaverteilung, die derjenigen der 10 und 30 min stimulierten Tiere ähnlich ist. Zusätzlich tritt dabei auch eine stärkere granuläre Reaktion des Cytoplasma auf.

Besprechung

Nachdem die im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Untersuchungen eindeutige Zusammenhänge zwischen der LAP-Aktivität in den Zellen des Rattenepithelkörperchens und dem Funktionszustand des Epithelkörperchens gezeigt haben, war es notwendig, auch die Frage einer Frühreaktion beim Beginn einer Stimulierung der Epithelkörperchenzellen zu einer Mehrleistung mit fermenthistochemischen Untersuchungen zu prüfen. Wie die Befunde zeigen, sind tatsächlich bereits nach wenigen Minuten einer durch Phosphatinjektion erzeugten Stimulierung Änderungen im histochemischen Bild erkennbar. Voraussetzung für diese Befunde ist die Verwendung einer Versuchsanordnung, wie sie EDER und HARTL (12) bei Untersuchungen über die funktionelle Morphologie der Epithelkörperchen durchführten. Im Gegensatz zu den zahlreichen, im Experiment erzeugten Epithelkörperchenüberfunktionen wird bei dieser Versuchsanordnung durch intravenöse Injektion den Epithelkörperchen eine hochkonzentrierte Phosphatlösung zugeführt, die

eine schlagartige Funktionssteigerung auslöst. Hierdurch ist sowohl der Zeitpunkt der Funktionssteigerung wie ihr Ausmass exakt definiert. Mit dieser Versuchsanordnung stellten EDER und HARTL (12) fest, dass am Epithelkörperchen ausserordentlich rasch Veränderungen eintreten. Bereits 3 min nach einmaliger Phosphatstimulierung wurde hierbei eine Kerngrössenzunahme gegenüber Kontrolltieren beobachtet, während das Cytoplasmavolumen abnahm. 15 min später tritt jedoch eine Umkehr dieser Grössenverschiebungen ein, d.h. die Kerngrössen nehmen jetzt ab und der Cytoplasmaanteil vergrössert sich. Umgekehrt verhalten sich Tiere mit einmaliger Calciuminjektion, d.h. also nach Ruhigstellung des Epithelkörperchens. Im Zusammenhang mit diesen Veränderungen wurden morphologische Kernveränderungen festgestellt, wie sie ALTMANN (2) bereits am exkretorischen Pancreas nach Stimulierung der Pancreassekretion beobachtet hatte. Der gemeinsame Nenner in beiden Untersuchungen liegt dabei in der durch Ausschüttung spezifischer Eiweissprodukte (der Enzymgranula am Pancreas und des Parathormons am Epithelkörperchen) ausgelösten Eiweissyntheseleistung der Zellen. Der von ALTMANN (2) beschriebene Funktionscyclus des Ruhekerns findet sich dabei in entsprechender Weise auch an Epithelkörperchenzellen. Während im Ruhezustand Nucleolarsubstanz in Form grosser Nucleoli im Zellkern nachweisbar ist, erfolgt nach dem Exkretionsreiz in der von ALTMANN (2) beschriebenen Extrusionsphase eine Ausschüttung dieser Nucleolusbestandteile in das Cytoplasma. Diese bereits im Prinzip von CASPERSSON (8a, 8b) festgestellten Veränderungen werden von ALTMANN (2) dahingehend präzisiert, dass bei der Ausstossung der Nucleolarsubstanz Einziehungen und Buchtenbildungen der Kernmembran entstehen, wobei sich die Nucleolen entweder direkt an die Kernmembran anlegen oder die Nucleolarsubstanz in vorgebildeten Chromatinleitschienen ins Cytoplasma ausgeschleust wird. Mit dem Übertritt in die perinucleäre Zone entsteht hier eine erhöhte Konzentration dieser Substanzen, deren Übertritt ins Cytoplasma die Voraussetzung für die Syntheseleistung der Zelle ist. Ähnliche Befunde haben SANDRITTER und Mitarb. (44) bei der Funktionssteigerung an Nebennierenrindenzellen beobachtet, wobei die Befunde dahingehend gedeutet werden, dass die ausgeschütteten RNS-Anteile zum Aufbau enzymtragender Strukturbestandteile im Cytoplasma verwandt werden. Entsprechend den Befunden von ALTMANN (2) fanden EDER und HARTL (12), dass nach 3 min dauernder Stimulierung zahlenmässig die Kerne der Epithelkörperchenzellen noch dem sogenannten Ruhebild von ALTMANN (2) entsprechen, jedoch im Unterschied von Kontrollen am zweithäufigsten Kerne mit randständigen Nucleolen zu beobachten sind, d.h. Kerne im Zustandsbild der Extrusionsphase nach ALTMANN (2). 15 min nach der Stimulierung nehmen dagegen Kerne der Extrusionsphase zahlenmässig bereits die erste Stelle ein, gefolgt von den Ruhekernen. Jene nehmen in den nächsten Minuten noch auf Kosten der Ruhekerne zu. Daraus wird gefolgert, dass die von ALTMANN (2) am Pancreas und inzwischen auch an anderen Organen festgestellten Beziehungen zwischen Kern und Cytoplasma bei der Funktionssteigerung auch für die Epithelkörperchen zutreffen, wobei allerdings die ausserordentlich rasche Zeitfolge der Veränderungen auffallend ist. Im Wesentlichen dürfte dies auf die besondere

Art der Versuchsanordnung zurückzuführen sein.

Aus den erwähnten Gründen wurde die Versuchsanordnung von EDER und HARTL (12) auch für die vorliegenden Untersuchungen verwandt, da sich hierdurch ein entsprechender Vergleich nunmehr mit histochemischen Befunden ergab. Tatsächlich zeigt sich, dass in genau den gleichen Zeitabständen auch im histochemischen Bild unter Anwendung der LAP-Reaktion am Ratten-Epithelkörperchen Veränderungen auftreten. Diese bestehen, soweit dies aus dem histochemischen Bild gefolgert werden kann, nicht in einer eindeutigen Zunahme des Substratumsatzes, d.h. der Enzymaktivität, sondern vielmehr in einer andersartigen Anordnung der histochemisch nachweisbaren Lokalisation des Enzyms in der Zelle. Bereits die Enzymanordnung in der normalen, nicht stimulierten Epithelkörperchenzelle zeigt einen auffallenden Befund. Hier findet sich die Enzymreaktion nicht nur diffus im Cytoplasma, sondern auch im Bereich des Kerns, bzw. der Kernmembran. Der zentrale Anteil des Zellkerns bleibt dabei in der Regel frei von Reaktionsniederschlägen. Dieser Befund ist deshalb auffallend, weil entsprechend dem üblichen Reaktionsausfall histochemischer Enzymreaktionen in anderen Organen auch bei Reaktionen wie etwa den im ersten Abschnitt dargestellten Dehydrogenasenachweisen das Reaktionsprodukt ausschliesslich im Cytoplasma angeordnet ist und der Kern typischerweise als optisch leerer Raum dargestellt wird. Während dies bei anderen Enzymreaktionen regelmässig der Fall ist, trifft dies nicht für die LAP-Reaktion zu. Damit entfällt die Deutungsmöglichkeit, dass diese Beobachtung einer Enzymreaktion im Bereich des Zellkerns auf eine optische Projektion von Cytoplasmareaktionen infolge zu grosser Schnittdicke zurückzuführen sei. Die in den vorliegenden Versuchen speziell für diese Fragestellung verwandten Schnittdicken bewegen sich in der Regel um 8 mμ, jedoch ist das gleiche optische Bild auch bei noch dünneren Schnitten beobachtbar. Nach dem histochemischen Bild würden somit Enzymreaktionen der LAP nicht nur im Cytoplasma, sondern auch im Kern anzunehmen sein.

In Zellkernen sind bisher lediglich ATP- und AMP-spaltende Fermente, das DPN-synthetisierende System (57), Isocitronensäure- und Äpfelsäuredehydrogenase (46, 26) sowie -in geringerer Konzentration als im Cytoplasma- sämtliche glykolytischen Enzyme (47) nachgewiesen. Der Kern ist dagegen frei von Oxydationsfermenten: Dem Warburg-Keilin-System, den gelben Fermenten und anderen Oxydasen (8a, 8b). Auf Grund der Tatsache, dass das Vorkommen von Peptidasen, speziell der LAP, im Kern bisher nicht beschrieben ist, muss man besondere Vorsicht bei der Deutung der Befunde walten lassen.

Die fortlaufenden Veränderungen des Enzymbildes zeigen sich vor allem am Kern. Wie aus der Darstellung hervorgeht, unterscheidet sich das histochemische Enzymbild der LAP im Kern nach Phosphatstimulierung deutlich von dem des Ruhekernes, und zwar in der Form, dass bei den Kontrolltieren die Fermentreaktion im Kern und auch im Cytoplasma teils diffus, teils granulär auftritt mit einer Aussparung der Reaktion in der Kernmitte. Nach 3 min Phosphatstimulierung verlagert

sich die Fermentreaktion in charakteristischer Form an die Kernplasmagrenze, wobei die Mehrzahl der Kerne in ihrem Zentrum nicht reagieren. Bei 10 und 30 min stimulierten Tieren verlagert sich die Enzymreaktion zunehmend in den Kern. Nach wesentlich längerer Stimulierung (19 Monate) wird die schon nach 10 und 30 min zu beobachtende Vergrösserung der Granula noch grösser und es tritt zusätzlich eine Mitbeteiligung des Cytoplasmas auf. Da diese Enzymverteilungen sich entsprechend den von EDER und HARTL (12) festgestellten morphologisch fassbaren Funktionsunterschieden synchron in fortlaufenden Zeitabständen verändern, scheint es sich tatsächlich um eine reelle LAP-Reaktion zu handeln. Artefakte, wie sie bei der Darstellung der alkalischen Phosphatase nach GOMORI (17b) durch Verlagerung des Reaktionsprodukts (Calciumphosphat) vom Ort der Spaltung zum Kern entstehen (28), erscheinen unwahrscheinlich, da hierbei eine weitgehende Übereinstimmung der Enzymbilder der verschieden lange stimulierten Epithelkörperchen zu erwarten wäre. Die Veränderungen der histochemischen Enzymreaktionen der LAP waren in jedem Fall reproduzierbar und sind mehrfach belegt. Insgesamt sprechen also die Befunde am Ruhekern und ihre Veränderungen an der stimulierten Zelle dafür, dass es sich tatsächlich um Reaktionen der LAP im Bereich des Kerns und des Cytoplasmas handelt.

Es entsteht nun die Frage, was diese im histochemischen Bild sichtbar werdende Ausschüttung der LAP aus dem Kern bedeutet. Nachdem die Veränderungen der histochemischen Reaktionen mit den morphologischen Strukturumwandlungen synchron gehen, d.h. dass nach spätestens 3 min morphologische Veränderungen im Sinn eines funktionellen Kernödems und der Zunahme der Kerne der Extrusionsphase (12) und histochemisch das Ausbleiben der Fermentreaktion, bzw. ihre Verlagerung an die Kernplasmagrenze sichtbar werden, muss erwogen werden, ob das histochemische Enzymbild seine Entstehung einer Veränderung der Löslichkeit oder der Konzentration des Enzyms durch den Flüssigkeitseinstrom in den Kern verdankt. Dagegen sprechen einige Befunde, insbesondere die Tatsache, dass bereits nach spätestens 10 min wieder eine starke Enzymreaktion im Zellkern feststellbar ist, die Phase des funktionellen Kernödems und die damit einhergehende Auflockerung der Kernplasmaschranke nach EDER und HARTL (12) jedoch länger dauert.

Die zweite Möglichkeit besteht in einer reellen Enzymverlagerung. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, ist das Enzym insbesondere nach 3 min an der Kernplasmagrenze bzw. in der perinucleären Zone des Cytoplasmas auffallend stark nachweisbar. Dies lässt an die Möglichkeit denken, die Enzymverlagerung im Rahmen der stimulierten Proteinsynthese zu sehen, wobei die perinucleäre Zone eine wesentliche Rolle spielt. Dabei besteht die Frage, ob das Enzym zusammen mit Nucleolarsubstanz ins Cytoplasma ausgeschleust wird. Dies stünde in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass bereits 3 min nach Phosphatstimulierung die Kerne der Extrusionsphase gegenüber Kontrolltieren vermehrt sind.

Insgesamt ist auf jeden Fall die kurze Latenzzeit bemerkenswert, nach der Veränderungen des Enzymbildes auftreten. Wie bereits betont, handelt es sich bei den durch 3, 10 und 30 min dauernden Phosphatstimulierungen hervorgerufenen Ver-

änderungen fast ausschliesslich um Verlagerungen des Enzyms, wobei eine Substratumsatzsteigerung mit der verwandten Methodik bis zu diesen Intervallen nach Phosphatstimulierung nicht fassbar war. Dass jedoch auch in kurzen Zeitabständen mit einer Antwort der Zelle auf den Reiz zu einer Mehrleistung mit einer Neubildung von Enzymen oder enzymtragender Proteinen gerechnet werden muss, beweisen neuere Untersuchungen an Mikroorganismen und Rattenleber (23, 27). Es zeigt sich dabei, dass nach spezifischer Induktion innerhalb einer nur wenige Minuten dauernden Latenzzeit Enzymproteine synthetisiert werden, also innerhalb von Grössenordnungen, die am stimulierten Epithelkörperchen umfassende Veränderungen erkennen lassen.

Wenn sich auch gezeigt hat, dass zahlreiche Fragen ungeklärt sind oder nur vorläufig beantwortet werden können, so kann jedenfalls festgehalten werden, dass zeitlich parallel zu den von EDER und HARTL (12) gefundenen morphologischen Strukturumwandlungen des Kerns und Cytoplasmas Veränderungen des Fermentbilds der LAP auftreten. Dieser Befund erhält dadurch seine Bedeutung, dass, wie im vorigen Kapitel festgestellt, die Substratumsetzung der LAP, bzw. ihre Aktivität bei Stimulierung des Epithelkörperchens zunimmt. Daraus ergibt sich eindeutig, dass die LAP im Rattenepithelkörperchen in Beziehung zum Funktionszustand der Zelle steht, sei es, dass das Enzym direkt in die Hormonsynthese mit eingreift, oder aber dass die LAP als Enzym des Eiweissstoffwechsels mitbeteiligt ist an den Eiweissstoffwechselvorgängen, die die funktionelle Stimulierung im Gefolge hat.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. An Epithelkörperchen des Menschen, Goldhamsters, Meerschweinchens und der Ratte wurde mit histochemischen Methoden das Vorkommen von 1-Leucylaminopeptidase, einem trypsinähnlichen Ferment mit Esteraseaktivität, verschiedenen Dehydrogenasen, ß-Glucuronidase, ATP-ase, alkalischer und saurer Phosphatase und DPN-Diaphorase untersucht. Dabei ergab sich bei der LAP ein echter Artunterschied in der Form, dass dies Ferment in Epithelkörperchen der Ratte ausserordentlich stark positiv war, während es beim Meerschweinchen nur schwach positiv und beim Menschen und Goldhamster histochemisch überhaupt nicht nachweisbar war. - Bei der Darstellung der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, der unspezifischen Esterase, Isocitronensäuredehydrogenase, Laktatdehydrogenase und Succinodehydrogenase fanden sich geringe quantitative Artunterschiede. Die übrigen Enzyme kamen artgleich vor.

2. An s.c. 3 Monate mit Ammoniumphosphat und Fe-III-glycerophosphat und an 25 Tage mit Ammoniumphosphat stimulierten und 25 Tage mit Calciumgluconat ruhiggestellten und an unbehandelten Rattenepithelkörperchen wurde festgestellt, dass der cytologisch erfassbaren Funktionssteigerung der Epithelkörperchen eine histochemisch nachweisbare Erhöhung des LAP-Substratumsatzes und einer Funktionsminderung der Epithelkörperchen eine Verminderung des LAP-Substratumsatzes parallel geht. Auf Grund dieser Befunde wurde ein Zusammenhang zwischen der Bereitstellung des Parathormons und der LAP-Aktivität angenommen.

3. Nach einmaliger Stimulierung von Rattenepithelkörperchen durch i.v. Injektion hoher Phosphatkonzentrationen fanden sich zeitlich parallel zu morphologischen Strukturumwandlungen bereits nach 3 min tiefgreifende, histochemisch erfassbare Veränderungen des Fermentbildes der LAP. Während das Ferment an unbehandelten Epithelkörperchen histochemisch diffus und feingranulär in Kern und Cytoplasma nachweisbar ist, ist es nach einer Latenzzeit von 3 min nach einmaliger i.v. Phosphatinjektion bei der Mehrzahl der Zellen histochemisch im Kernzentrum nicht nachweisbar. 10 und 30 min nach der Phosphatstimulierung tritt eine zunehmende grobgranuläre Fermentreaktion des Kerns und nach chronischer Stimulierung auch des Cytoplasmas auf. Nach diesen Befunden ergibt sich an Rattenepithelkörperchen auch eine cytochemisch nachweisbare Beziehung zwischen der LAP-Aktivität und dem Funktionszustand der Zellen.

Herrn Priv.Doz.Dr.M.EDER danke ich für die Überlassung des Themas und die jederzeit grosszügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRIGHT, F. and ELLSWORTH, R.:
   Studies on the physiology of the parathyroid glands. Calcium an phosphorus studies on a case of idiopathic hypoparathyroidism. J.Clin.Invest. 7, 183 (1929)

2. ALTMANN, H.W.:
   a) Zur Morphologie der Wechselwirkungen von Kern und Cytoplasma. Klin. Wschr. 33, 306 (1955)
   b) Über den Funktionsformwechsel des Kernes im exokrinen Gewebe des Pankreas. Z.Krebsf. 58, 632 (1952)

3. BALOGH, K. and COHEN, B.R.:
   Oxydative enzymes in the epithelial cells of normal and pathological human parathyroid glands. Laborytory investigation 10, 354 (1961)

4. BERGER, J. and JOHNSON, M.J.:
   The occurence of leucinaminopeptidase. J.Biol.Chem. 133, 157 (1940)

5. BERGMANN, M.:
   A classification of proteolytic enzymes. Adv.Enzymol. 2, 49 (1942)

6. BÜNGELER, W.:
   Die Definition des Geschwulstbegriffes und die Abgrenzung der Hyperplasien gegenüber den Geschwülsten. Sonderdruck aus Verh.Dt.Ges.f.Pathol. 35.Tagung Hannover. S.10 (1951)

7. CARNES, W.H., PAPPENHEIMER, A.M. and STOERK, H.C.:
   Volume of parathyroid gland in relation to diatary calcium and phosphorous. Proc.Soc.Exper.Biol. and Med. 51, 514 (1942)

8. CASPERSSON, T.:
   a) Studien über den Eiweissumsatz der Zelle. Naturw. 29, 33 (1941)
   b) The relations between nucleic acid and protein syntheses. Symposia Soc. Exper.Biol. 1, 127 (1947)

9. COLLIP, J.B.:
   The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium. J. of Biol. Chem. 63, 395 (1925)

10. DAVIES, B.M.A.:
    The extraction and estimation of human urinary parathyroid hormone. J.Endocrin. 16, 369 (1958)

11. EDER, M.:
a) Experimentelle und histochemische Untersuchungen über herdförmige Hyperplasien im Epithelkörperchen. Virch. Arch. path. Anat. 334, 324 (1961)
b) Morphologische Untersuchungen über herdförmige Epithelkörperchenhyperplasien. Virch. Arch. path. Anat. 333, 301 (1961)

12. EDER, M. und HARTL, F.:
Zur funktionellen Morphologie der Epithelkörperchenzellen. Beitr. pathol. Anat. und allg. Path. 115, 3 (1955)

13. EGER, W.:
Die experimentelle ostitis fibrosa generalisata und ihre Stellung zur renalen Rachitis. Klin. Wschr. 20, 353 (1941)

14. FOLK, J.E. and BURSTONE, M.S.:
Chromogenic lycyl substrates for aminopeptidase and papain. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89, 473 (1955)

15. FRUTON, J.S.:
On the proteolytic enzymes of animal tissues. V. Peptidase of skin, lung, and serum. J. Biol. Chem. 166, 721 (1946)

16. GLENNER, G. and COHEN, A.:
Histochemical demonstration of a species specific trypsin-like enzyme in mast cells. Nautre 185, 846 (1960)

17. GOMORI, G.:
a) Chromogenic substrate for aminopeptidase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87, 559 (1954)
b) "acid ans alkaline phosphatase" in Microscopic Histochemistry. The university of chicago press. 175 (1953)

18. GORDON, A.H.:
Conditions for zone electrophoresis of parathyroid hormone. Biochem. J. 63, 28 (1956)

19. GREEN, M.N., TSOU, K.C., BRESSLER, R. and SELIGMAN, A.M.:
The colorimetric determination of leucine aminopeptidase activity with 1-leucyl-ß-naphthylamide hydrochloride. Arch. Biochem. Biophys. 57, 458 (1955)

20. GREENWALD, I. and GROSS, J.:
The effect of long-contineced administration of parathyroid extract upon the excretion of phosphorus and calcium. J. of Biol. Chem. 68, 325 (1926)

21. GREEP, R.O.:
The physiology and chemistry of the parathyroid hormone. In "the hormones", G. Pincus and K.V. Thiemann, vol. I, 255 (1958)

22. GREEP, R.O. and KENNY, K.:
"The hormones". vol.III, 166, New York Academic Press (1955)

23. GROS, F., HIATT, H., GILBERT, W., KURLAND, C.G. RISEBROUGH, R.W., WATSON, J.D.:
Unstable ribonucleic acid revealed by pulse labelling of escherichia coli. Nature 190, 581 (1961)

24. HESS, R., SCARPELLI, D.G. and PEARSE, A.G.E.:
J.biophys.biochem.Cytol. 4, 753 (1958). The cytochemical localisation of oxydative enzymes. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases.

25. L'HEUREUX, M.V., TEPPERMANN, H.M. and WILHELMI, A.E.:
A new preparation of the parathyroid hormone. J. of Biol.Chem. 168, 167 (1947)

26. HOGEBOOM, G.H. and SCHNEIDER, W.C.:
cytochemical studies of mammalian tissues. Isocitric dehydrogenase and triphosphopyridine nucleotid-Cytochrom-reductase of mouse liver. J.biol. chem. 186, 417 (1950)

27. HÜBENER, H.J.:
Die physiologische Funktion der Nebennierenrindenhormone als Enzyminduktor. Dt.med.Wschr. 87, 438 (1962)

28. JOHANSEN, G., LINDERSTROM-LANG, K.:
Liberation, diffusion and precipitation of phosphate in the Gomori test. Acta med.scand. 142, 601 (1952)

29. LANGE, R.:
Zur Histologie und Cytologie der glandula parathyreoidea des Menschen. Zschr.f.Zellforschung 53, 765 (1961)

30. LEUTHARDT, F.:
a) Die Nebenschilddrüsen. In "Lehrb.Phys.Che." 688-692. Walter de Gruyter u. Co. (1957)
b) Proteasen. In "Lehrb.Phys.Che." 192-201. Walter de Gruyter u. Co. (1957)

31. LINDERSTRÖM-LANG, K.:
Über Darmerepsin. Z.physiol.Chem. 182, 151 (1929)

32. NACHLAS, M.M., CRAWFORD, D.T. and SELIGMAN, A.M.:
The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase. J.of Histochem. and Cytochem. 5, 264 (1957)

33. NACHLAS, M.M., PRINN, W. and SELIGMAN, A.M.:
Quantitative estimation of lyo- and desmoenzymes in tissue sections with and without fixation. J.of Biophys. and Biochem.Cytology, 2, 487 (1956)

34. NACHLAS, M.M., WALKER, D.G., SELIGMAN, A.M.:
A histochemical Method for the demonstration of DPN-Diaphorase. J.biophys. biochem.Cytol. 4, 29, (1958)

35. PARDEE, A.B., PRESTIDGE, L.S.:
the initial kinetics of enzyme iduction. Biochem.Biophys.Acta 49, 77 (1961)

36. PEARSE, A.G.E.:
Histochemistry, Churchill LTD, London. sec.ed. (1960)

37. PEARSE, A.G.E. and TREMBLAY, G.:
a) Leucine aminopeptidase in rat parathyroid and its relation to parathyroid hormone production. Nature 181, 1532 (1958)
b) A cytochemical study of oxydative enzymes in the parathyroid oxyphil cell and their functional significance. Brit.J.exp.Path. 40, 66 (1959)

38. PIERRE, M.P., de BOISSEZON, P. et LOMBARD, Ch.:
Variations pondérales des parathyroides externes du lapin et du chien sous l'influence d'injections parentérales répétées de phosphate de sodium et du gluconate de calcium. C.r.Soc.Biol.Paris 130, 341 (1939)

39. REID, E.B., STEVENS, B.M.:
"Rapidly labelled" ribonucleic acid in rat liver "Calcium supernatant" fractions. Biochem.Biophys.Acta 49, 215 (1961)

40. de ROBERTIS, E.:
a) Proteolytic enzyme activity of colloid extracted from signle follicles of the rat thyroid. Anat.Rec. 80, 219 (1949)
b) The cytology of the parathyroid gland of rats injectes with parathyroid extract. Anat.rec. 78, 473 (1940)

41. ROSS, W.F. and WOOD, T.R.:
The partial purification and some observations on the nature of the parathyroid hormone. J. of Biol.Chem. 146, 49 (1942)

42. RUTISHAUSER, E.:
a) Osteodystrophie nephrogene. Ann.d'anat.path. 13, 96 (1936)
b) Über experimentelle Erzeugung von Ostitis fibrosa. Zbl.Path. 53, 305 (1932)

43. SANDRITTER, W., FEDERLIN, K. und GERATZ, D.:
Zur Morphologie und Funktion der Epithelkörperchenzellen. Quantitative und qualitative histochemische Untersuchungen an Epithelkörperchen von Ratten. Frankf.Zschr.Path. 66, 290 (1955)

44. SANDRITTER, W. und HÜBOTTER, F.:
Über die Bedeutung des Nucleolus in der Nebennierenrinde. Frankf.Zschr. Path. 65, 219 (1954)

45. SCARPELLI, D.G., HESS, R. and PEARSE, A.G.E.:
The cytochemical localisation of oxydative enzymes. J.biochem.cytol. 4, 747 (1958)

46. SHEPHARD, J.A.:
Factors influencing the determination of the intracellular distribution of isocitric dehydrogenase in rabbit cerebral cortex. J.histochem.cytochem. 4, 47 (1956)

47. SIEBERT, G.:
Enzyme und Substrate in insolierten Zellkernen. Biochem.Zschr. 334, 369 (1961)

48. SMITH, E.L.:
a) The peptidases of skeletal, heart an uterine muscle. J.Biol.Chem. 173, 553 (1948)
b) The specifity of certain peptidases. Adv.Enzymol. 12, 191 (1951)

49. SMITH, E.L. and BERGMANN, M.:
a) The activation of intestinal peptidases by manganese. J.Biol.Chem. 138, 789 (1941)
b) The peptidases of intestinal mucosa. J.Biol.Chem. 153, 627 (1944)

50. SMITH, E.L. and POLGLASE, W.J.:
The specifity of leucine aminopeptidase. II.Optical and side chain specifity. J.Biol.Chem. 180, 1209 (1949)

51. SMITH, E.L., SPACKMAN, D.H. and POLGLASE, W.J.:
The specifity of aminopeptidase. III.Action on diastrereoisomers. J.Biol. Chem. 199, 801 (1952)

52. SMITH, E.L. and SPACKMAN, D.H.:
Leucine aminopeptidase. V.Activation, specifity and mechanism of action. J.Biol.Chem. 212, 271 (1955)

53. STERN, H., ALLFREY, V., MIRSKY, A.E. and SAETREN, H.:
Some enzymes of isolated muclei. J.Gen.Physiol. 35, 559 (1952)

54. SUMNER, J.B. and MYRBÄCK, K.:
"The enzymes". Academic press, Inc. New York. 1, 810 (1951)

55. WERNLY, M.:
Parathyreoidea. In "Klinik d.Inneren Sekretion" v.A.Labhart, 824.Springer Verlag (1957)

56. WILLSTÄTTER, R. und ROHDEWALD, M.:
Über pancreatisches desmo-Enzym. II.Abhandlung: Zur Kenntnis zellgebundener Enzyme der Gewebe und Drüsen. Z.physiol.Che. 218, 77 (1933)

57. ZELLER, E. A.:
Allgemeine Physiologie und Pathologie der Enzyme in "Handbuch d. allg. Path." Büchner, F., Letterer, E., Roulet, F., 278. Springer Verlag (1955)

LEBENSLAUF

Ich wurde als Sohn des Dr. med. Heribert Nolte und seiner Frau Anneliese, geb. Scholand, am 29.10.1937 in Freiburg im Briesgau geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1947 in das Schiller-Gymnasium Offenburg ein und legte dort 1956 das Abitur ab. Nach meinem Entschluss, Medizin zu studieren, immatrikulierte ich mich im Sommersemester 1956 an der Albert-Ludwig-Universität in Freiburg im Breisgau. Nach Abschluss der vorklinischen Semester in Freiburg durch das Physikum im Sommersemester 1958, war ich während der klinischen Semester in München immatrikuliert. Am 18.12.1961 schloss ich in München mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab. Seit dem 1.1.1962 bin ich als Medizinalassistent am Pathologischen Institut der Universität München tätig.